



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :

C12N 15/10, C07K 14/47, A61K 48/00

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 98/11208

(43) Date de publication internationale:

19 mars 1998 (19.03.98)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01594

(22) Date de dépôt international: 10 septembre 1997 (10.09.97)

(30) Données relatives à la priorité:

96/11075

11 septembre 1996 (11.09.96)

FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (US seulement): CAVALLINI, Bruno [FR/FR]; 13, rue Sainte-Cécile, F-67100 Strasbourg (FR).

(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AU, CA, JP, SG, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

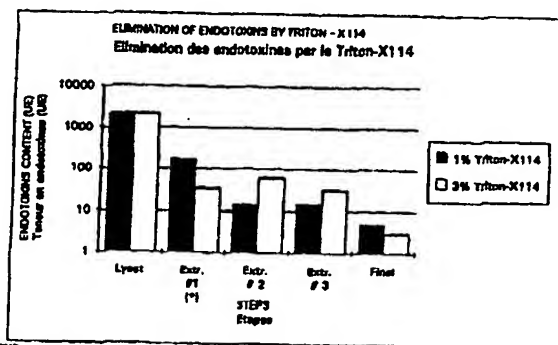
Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: METHOD FOR PREPARING A PLASMID DNA

(54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE



LEGEND

Légende :

Lysate

Extr. #1 (\*)

Extr. #2

Extr. #3

Final

Lysate alkali initial INITIAL ALKALINE LYSATE

Après la 1ère extraction par le Triton X-114 AFTER 1st EXTRACTION BY TRITON X-114

Après la 2ème extraction par le Triton X-114 AFTER 2nd EXTRACTION BY TRITON X-114

Après la 3ème extraction par le Triton X-114 AFTER 3rd EXTRACTION BY TRITON X-114

Produit final après précipitation alcoolique FINAL PRODUCT AFTER ALCOHOL PRECIPITATION

## (57) Abstract

The invention concerns a method for preparing a plasmid DNA using a wet cell biomass comprising after resuspension of said biomass the following steps: alkaline lysis, high ionic strength acidification, elimination of solubles, endotoxin and contaminating RNA reduction, filtering gel chromatography and conditioning. The invention also concerns a pharmaceutical composition containing a plasmid DNA and its use for gene therapy.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un procédé de préparation d'un ADN plasmidique à partir d'une biomasse cellulaire humide comprenant après la resuspension de ladite biomasse, une étape de lyse alcaline, une étape d'acidification à force ionique élevée, une étape d'élimination des insolubles, une étape de réduction des endotoxines et des ARN contaminants, une étape de chromatographie de gel de filtration et une étape de conditionnement. Elle a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant un ADN plasmidique ainsi préparé et son utilisation à des fins de thérapie génique.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bразил	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## PROCEDE DE PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE

La présente invention a pour objet un nouveau protocole de purification d'ADN plasmidique permettant de produire en grande quantité un ADN d'une qualité pharmaceutique acceptable pour une utilisation chez l'homme. Elle concerne également une composition pharmaceutique comprenant l'ADN ainsi obtenu et son utilisation pour le transfert d'un acide nucléique dans une cellule hôte. L'invention présente un intérêt tout particulier pour des perspectives de thérapie génique.

Le transfert de gènes dans une cellule donnée est à la base même de la thérapie génique. Cette nouvelle technologie dont le champ d'application est vaste, permet d'envisager le traitement de maladies graves pour lesquelles les alternatives thérapeutiques classiques sont peu efficaces voire inexistantes et concerne aussi bien les maladies génétiques (hémophilie, mucoviscidose, myopathie....) qu'acquises (cancer, syndrome d'immunodéficience acquise SIDA, ...). L'approche la plus pratiquée consiste à utiliser un véhicule viral pour introduire l'acide nucléique thérapeutique dans la cellule à traiter et, en particulier, rétroviral et adénoviral. En effet, les virus ont développé des mécanismes sophistiqués pour traverser les membranes cellulaires, échapper à la dégradation au niveau des lysosomes et faire pénétrer leur génome dans les noyaux afin d'assurer l'expression du gène thérapeutique. Cependant, l'approche virale a ses limitations, notamment une capacité de clonage restreinte, une production potentielle de particules virales compétentes pour la replication susceptibles de dissémination dans l'organisme hôte et l'environnement, un risque de mutagenèse insertionnelle dans le cas des vecteurs rétroviraux et, pour ce qui est des vecteurs adénoviraux, une induction de réponses immunitaires et inflammatoires chez l'hôte qui entravent les répétitions de traitement. Ces inconvénients importants dans le cadre d'un usage humain justifient la recherche de systèmes alternatifs de transfert d'acides nucléiques.

De plus en plus de méthodes de transfert de gènes font appel à des vecteurs non viraux. Une des plus employées consiste à délivrer l'acide nucléique thérapeutique au moyen de vecteurs synthétiques, tels que les lipides cationiques qui interagissent spontanément avec l'acide nucléique pour former des complexes chargés positivement capables de fusionner avec les membranes cellulaires anioniques et faire pénétrer l'acide nucléique qu'ils

transportent (voir par exemple Behr, Bioconjugate Chemistry (1994) 5 : 382). Une méthode dite biolistique ("gene gun") par bombardement des cellules par des microprojectiles métalliques recouverts d'ADN a été récemment employée dans le cadre d'un essai anti-SIDA (Woffendin et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 2889-2894). Enfin, une approche  
5 encore plus simple peut également être envisagée par administration directe de l'ADN nu, notamment dans le cadre des maladies touchant les muscles par injection intramusculaire. Ces méthodes non virales mettent généralement en oeuvre un vecteur plasmidique portant le gène thérapeutique et les éléments nécessaires à son expression.

La réalisation d'essais cliniques reposant sur des méthodes non virales nécessite de  
10 pouvoir produire des quantités importantes d'ADN plasmidique de qualité pharmaceutique. Les méthodes classiquement utilisées ne sont pas optimales puisqu'elles utilisent des enzymes d'origine animale (lysozyme, protéinase, ribonucléase...), des solvants organiques connus pour leur toxicité (phénol, chloroforme) et des composés mutagènes (bromure d'éthidium) susceptibles de contaminer le produit final. De plus, leur mise en oeuvre à l'échelle  
15 industrielle est difficilement réalisable.

Les demandes internationales WO95/21250 et WO96/02658 décrivent des procédés de préparation d'ADN plasmidique sous forme purifiée utilisables pour des essais humains. Cependant, il est connu que diverses variables peuvent influencer l'efficacité de méthodes préparatives, notamment le plasmide à purifier, sa taille, le microorganisme qui le produit,  
20 les conditions et le milieu de fermentation. Dans ce contexte, il est avantageux de pouvoir disposer d'une nouvelle méthode pour la production de grandes quantités d'ADN plasmidique de qualité pharmaceutique.

On a maintenant trouvé une nouvelle méthode de préparation d'ADN plasmidique  
25 comprenant une succession d'étapes simples à mettre en oeuvre, évitant l'usage de produits d'origine animale, toxiques et mutagènes tels que ceux cités ci-avant et adaptables à l'échelle industrielle. L'ADN est produit avec un rendement élevé, sous forme substantiellement pure et d'une qualité compatible avec un usage humain. Les contaminations résiduelles par les protéines, endotoxines, ARN et ADN génomique du microorganisme producteur sont  
30 particulièrement faibles voire non détectables par les techniques standards de détection. Les exemples qui suivent montrent également que ce procédé permet la purification de manière

efficace d'un plasmide de grande taille incorporant l'ADNc de la dystrophine destiné au traitement de la myopathie de Duchenne.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un procédé pour préparer un ADN plasmidique à partir d'une biomasse cellulaire humide récoltée après fermentation d'une cellule productrice comprenant ledit ADN plasmidique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) lyse alcaline de la biomasse resuspendue, après resuspension de la biomasse cellulaire humide
- b) acidification à force ionique élevée,
- 10 c) élimination des insolubles,
- d) réduction des endotoxines et des acides ribonucléiques (ARN),
- e) chromatographie de gel filtration, et
- f) conditionnement.

15 Au sens de la présente invention "ADN plasmidique" désigne un élément cellulaire extrachromosomique formé d'une molécule d'ADN généralement circulaire capable de replication autonome dans une cellule productrice (la cellule dans laquelle il est amplifié). Le choix des plasmides utilisables dans le procédé de la présente invention est vaste. Ils peuvent être d'une origine quelconque (procaryote, eucaryote) ou être formés par  
20 l'assemblage d'éléments variés. D'une manière générale, les plasmides sont connus de l'homme de l'art. Un grand nombre d'entre eux sont disponibles commercialement mais, il est également possible de les construire par les techniques de manipulation génétique (Maniatis et al., 1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Il peut s'agir d'un vecteur de clonage ou d'expression dérivé par  
25 exemple de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagène), pREP4, pCEP4 (Invitrogene) ou encore p Poly (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201).

Avantageusement, un plasmide mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention possède les éléments génétiques qui lui permettent de se répliquer de manière autonome dans la cellule productrice et, de manière optionnelle, dans une cellule hôte (cellule dans  
30 laquelle l'effet thérapeutique est recherché). De tels éléments peuvent être constitués entre autre par une origine de replication assurant l'initiation de la replication dans une bactérie,

une levure, un champignon ou une cellule mammifère. Elle peut être isolée d'un procaryote (ColE1...), d'un eucaryote (2 $\mu$  ou ARS pour séquence à replication autonome), d'un virus (SV40 ori du virus simien 40, oriP du virus Epstein Barr EBV...) ou d'un bactériophage (flori...). Le choix de l'origine de replication appropriée est à la portée de l'homme de l'art.

5 Par exemple, pour un plasmide destiné à être produit dans le microorganisme *Escherichia coli* (*E. coli*), on retiendra l'origine ColE1. De plus, si l'on désire qu'il soit autoreplicatif dans une cellule hôte mammifère, il comprendra également une origine fonctionnelle chez un eucaryote par exemple oriP et pourra inclure le gène codant pour la protéine EBNA-1 du virus EBV nécessaire à la replication à partir de cette dernière (Lupton et Levine, 1985, 10 Mol. Cell. Biol. 5, 2533-2542 ; Yates et al., Nature 313, 812-815).

Par ailleurs, un plasmide en usage dans la présente invention peut en outre comprendre un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules transfectées (cellules productrices et/ou cellules hôtes). On peut appliquer les méthodes de sélection reposant sur le principe de cellules productrices déficientes (par mutations 15 auxotrophes ou introduction d'un gène léthal) incapables de pousser en l'absence d'un plasmide portant un gène complétant cette déficience (par exemple système dap décrit dans la demande EP 0 258 118, complémentation d'une mutation d'auxotrophie, usage de gènes codant pour un tARN suppresseur sup E, supF...). Une autre pratique couramment employée consiste à intégrer dans le plasmide un gène codant pour la résistance à un 20 antibiotique (ampicilline, kanamycine, tétracycline...). Bien entendu, il peut comprendre des éléments supplémentaires améliorant son maintien et/ou sa stabilité dans une cellule hôte ou productrice. A cet égard, on peut citer la séquence *cer* dont la présence favorise le maintien monomérique d'un plasmide (Summers et Sherrat, 1984, Cell 36, 1097-1103) et certaines séquences d'origines virales (LTR de rétrovirus, ITR d'un virus associé à l'adénovirus ...) ou 25 cellulaires permettant l'intégration dans les chromosomes de la cellule hôte.

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, un plasmide en usage dans la présente invention est destiné à transporter un ou plusieurs gène(s) d'intérêt thérapeutique dans une cellule hôte. D'une manière générale, le gène d'intérêt peut coder pour un ARN antisens, un ARN messager qui sera ensuite traduit en polypeptide d'intérêt, 30 un ribozyme ou encore un ARN conférant un bénéfice thérapeutique direct (ARN VA d'un adénovirus capable de réprimer la réponse immunitaire, ARN activant la synthèse

d'interféron) (Abbas et al. in Cellular and Molecular Immunology ; W.B., Saunders Company Harcourt Brace Jovanovich, Inc. p. 228).

Le gène d'intérêt peut être isolé par toute technique conventionnelle telle que clonage, PCR (Polymerase Chain Reaction) ou encore synthétisé chimiquement. Il peut être de type génomique (muni d'un ou plusieurs introns) ou ADN complémentaire (ADNc). Le polypeptide d'intérêt peut être constitué par une protéine mature, un précurseur et, notamment un précurseur destiné à être sécrété et comprenant un peptide signal, une protéine tronquée, une protéine chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses ou encore une protéine mutée présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées.

A titre d'exemples, on peut avoir recours à un gène d'intérêt sélectionné parmi ceux codant pour les polypeptides suivants :

- cytokines ou lymphokines (interférons  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , interleukines et notamment l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 ou l'IL-12, facteurs nécrosant des tumeurs (TNF), facteurs stimulateurs de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...);
- récepteurs cellulaires ou nucléaires, notamment ceux reconnus par des organismes pathogènes (virus, bactéries, ou parasites) et, de préférence, par le virus VIH (Virus de l'Immunodéficience Humain) ou leurs ligands ;
- protéines impliquées dans une maladie génétique (facteur VII, facteur VIII, facteur IX, dystrophine ou minidystrophine, insuline, protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), hormones de croissance (hGH) ;
- enzymes (uréease, rénine, thrombine....) ;
- inhibiteurs d'enzymes ( $\alpha$ 1-antitrypsine, antithrombine III, inhibiteurs de protéases virales...);
- polypeptides à effet anti-tumoral capables d'inhiber au moins partiellement l'initiation ou la progression de tumeurs ou cancers (ARN anti-sens, anticorps, inhibiteurs agissant au niveau de la division cellulaire ou des signaux de transduction, produits d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, par exemple p53 ou Rb, protéines stimulant le système immunitaire....) ;
- protéines du complexe majeur d'histocompatibilité des classes I ou II ou protéines

régulatrices agissant sur l'expression des gènes correspondants ;

- polypeptides capables d'inhiber une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou son développement (polypeptides antigéniques ayant des propriétés immunogènes, épitopes antigéniques, anticorps, variants trans-dominants susceptibles d'inhiber l'action d'une protéine native par compétition...) ;
- toxines ( thymidine kinase de virus simplex de l'herpès 1 (TK-HSV-1), ricine, toxine cholérique, diphtérique.....) ou immunotoxines ; et
- marqueurs ( $\beta$ -galactosidase, luciférase.....).

10 Bien entendu, le gène d'intérêt peut être placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans la cellule hôte. Par "éléments nécessaires à son expression", on désigne l'ensemble des éléments permettant sa transcription en ARN et la traduction d'un ARNm en polypeptide. Parmi ceux-ci le promoteur revêt une importance particulière. Il peut dériver d'un gène quelconque (eucaryote, viral, promoteur naturel du

15 gène d'intérêt en question...) ou peut être artificiel. Par ailleurs, il peut être constitutif ou régulable. Alternativement, il peut être modifié de manière à améliorer l'activité promotrice, supprimer une région inhibitrice de la transcription, modifier son mode de régulation, introduire un site de restriction, .... On peut mentionner, à titre d'exemples, les promoteurs viraux CMV (Cytomegalovirus), RSV (Rous Sarcoma Virus), du gène TK du virus HSV-1,

20 précoce du virus SV40, adénoviral MLP, ..., ou encore les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycerate kinase) murin ou humain,  $\alpha$ 1-antitrypsine (foie-spécifique), immunoglobulines (lymphocyte-spécifique).

De tels éléments peuvent également comprendre des éléments additionnels tels que introns, séquence signal, séquence de localisation nucléaire, séquence terminatrice de la

25 transcription (polyA), site d'initiation de la traduction de type IRES ou autre, etc.

Un plasmide en usage dans la présente invention est amplifié dans une cellule productrice avant d'être purifié selon le procédé de la présente invention. On préfère tout particulièrement les bactéries gram négatif et, notamment, *E. coli*. A titre indicatif, on peut citer les souches DH5 (Grant et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4645-4649),

30 MC1061 (Wertman et al., 1986, Gene 49, 253-262) et ses dérivées comme DH10B (Grant et al., 1990, *supra*). Etant donné qu'il s'agit d'une technologie largement connue à ce jour,



il ne sera procédé qu'à une description brève de la manière d'opérer pour introduire un plasmide dans une bactérie et l'amplifier. Toutes les techniques conventionnelles peuvent être employées dans le cadre de la présente invention (traitement par les chlorures de calcium, de rubidium, d'hexamine cobalt, par des agents réducteurs, par le DMSO, électroporation, transduction, liposomes, ... ; Maniatis et al., 1989, *supra*). Les cellules productrices ainsi transformées sont ensuite cultivées selon les pratiques générales de l'art (fermentation en continue "batch" ou alimentée "fed batch"). Les conditions de culture peuvent être facilement établies par l'homme du métier sur la base des connaissances générales dans ce domaine et du système de sélection porté par le plasmide. Leur récolte est effectuée selon les techniques habituelles, comme la filtration ou encore la centrifugation à faible vitesse, pour générer la biomasse cellulaire humide laquelle peut, à ce stade, être congelée ou stockée à 4°C avant d'être soumise au procédé selon l'invention.

Selon le procédé de l'invention, on effectue la lyse de la biomasse cellulaire humide après avoir procédé à sa resuspension. On emploie généralement un tampon de resuspension légèrement basique pour neutraliser le caractère acide de la pâte cellulaire et de force ionique faible ne présentant pas ou peu d'effets lytiques sur les cellules transformées. Sa composition et son pH peuvent varier en particulier en fonction de la cellule productrice, du milieu de culture employé ou tout autre paramètre. L'homme de l'art est en mesure d'élaborer un tampon de resuspension approprié. On peut citer à titre d'exemple un tampon contenant de l'EDTA (concentration de 1 à 50 mM, de préférence 10 mM) et du Tris-HCl (concentration de 10 à 100 mM, de préférence 50 mM) tamponné à un pH d'environ 8. Les cellules peuvent être resuspendues par tout moyen technique habituel tel que agitation rectilinéaire, pipetage répété et/ou homogénéisateur (vortex, homogénéisateur par cisaillement...).

L'étape de lyse alcaline permet de libérer le contenu cellulaire et en solubiliser tous les composants. Protéines, ARN et ADN sont dénaturés y compris l'ADN plasmidique dont les deux brins homologues restent enchevêtrés, à la différence de l'ADN génomique. Il peut être avantageux d'effectuer la lyse alcaline en présence d'un détergent et, de préférence, d'un tensioactif anionique. Le choix de la base et du tensioactif n'est pas limité. A cet égard, la combinaison soude et SDS (sodium dodécylsulfate) est préférée, notamment à des concentrations finales aux environs de 0,1 M et 0,5 % respectivement. Le pH final de la

solution de lyse est, de préférence, compris entre 11 et 13 et, de manière optimale, entre 12,2 et 12,4. On indique qu'il est préférable de mélanger les cellules transformées resuspendues et la solution de lyse d'une manière douce, par exemple par inversion, afin de minimiser les cassures de l'ADN cellulaire génomique qui serait alors susceptible de contaminer la préparation d'ADN plasmidique. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un mode préféré, il est néanmoins possible dans le cadre de la présente invention de faciliter la lyse cellulaire par chauffage à température élevée (voir par exemple la demande internationale WO96/02658) ou l'emploi d'enzymes animales dégradant les membranes cellulaires (lysozyme...).

La seconde étape du procédé selon l'invention résulte en une acidification à haute force ionique du lysat obtenu précédemment. L'acidification se fait de préférence d'une manière brutale, c'est à dire en une seule fois. Dans ces conditions, l'ADN plasmidique est renaturé rapidement alors que la grande majorité des protéines, de l'ADN génomique dénaturé et des espèces d'ARN insolubles en condition de force ionique élevée flocculent. Dans le cadre de la présente invention, on met en oeuvre une solution comprenant un tampon ou un acide fort combiné à un sel dont le pH est compris entre 4,5 et 6,5. Selon un mode de réalisation avantageux, on utilise une solution d'acétate de potassium de préférence, à une concentration finale proche de 1 M, de manière à obtenir un pH final d'environ 5,1. Mais, on aurait également pu avoir recours à une solution d'acétate de sodium de pH et de concentration tels qu'indiqués ci-dessus.

On procède ensuite à l'élimination des insolubles constitués par les débris cellulaires et les floculats de macromolécules. Ceci peut être réalisé par toute technique conventionnelle de filtration ou centrifugation. Il peut être judicieux d'éliminer la majorité des insolubles d'abord par centrifugation puis de poursuivre la clarification par filtration. De nombreux filtres peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention à la condition qu'ils retiennent les insolubles et laissent passer l'ADN plasmidique. Avantageusement, le filtre choisi aura une porosité comprise entre 1 et 100  $\mu\text{m}$ , plus avantageusement 2 et 75  $\mu\text{m}$ , de préférence 5 et 75  $\mu\text{m}$ , de manière tout à fait avantageuse, 3 et 50  $\mu\text{m}$ , et, de manière tout à fait préférée, 10 et 50  $\mu\text{m}$ . Il peut être en matière synthétique comme le nylon, organique comme la cellulose ou non organique comme le verre. Selon un mode de

réalisation avantageux, on procède à des filtrations successives à l'aide de filtres de porosités décroissantes, par exemple une première filtration sur verre fritté d'une porosité comprise entre 100 et 40  $\mu\text{m}$  (fritté N° 2, Schott AG), la seconde sur fritté de porosité 16 à 40  $\mu\text{m}$  (fritté N° 3, Schott AG) et la dernière sur fritté de porosité 10 à 16  $\mu\text{m}$  (fritté N° 4, Schott AG).

Selon une autre variante, il est possible de procéder à une seule filtration en utilisant une cartouche en polypropylène Sartopure PP de porosité 8  $\mu\text{m}$  (Réf. 552 1302 P9-00-A) ou Sartopure PP2 de porosité 3  $\mu\text{m}$  (Réf. 559 1302 P9-00-A).

Selon un mode de réalisation optionnel mais particulièrement avantageux, le filtrat peut être concentré avant l'étape suivante de réduction des endotoxines. Les moyens de concentrer un ADN dissous dans une solution aqueuse sont connus de l'homme de l'art. On peut citer l'ultrafiltration, la précipitation alcoolique ou encore une combinaison de ces deux techniques.

En ce qui concerne l'ultrafiltration, diverses membranes peuvent être employées du moment qu'elles n'adsorbent pas ou peu l'ADN plasmidique dans les conditions d'utilisation. On aura avantageusement recours à des membranes dont le seuil de coupure est compris entre 20 et 300 kDa, de préférence entre 30 et 100 kDa. Elles peuvent être de compositions variées, organiques ou non (poly(ether)sulfone, acetate de cellulose, ...). Les membranes particulièrement adaptées sont celles de type YM (et notamment, YM30-76, Diaflo et YM30-4208, Centricon), celles équipant les unités Easy Flow (référence 14669-OS-1V ou 14669-OS-2V, Sartorius) ou encore minipellicon 2 PL300 (Millipore en cellulose régénérée). L'ultrafiltration constitue à cette étape un moyen puissant de réduire la contamination de la préparation d'ADN plasmidique par des pigments d'origine cellulaire ou provenant du milieu de culture.

Il est également possible de concentrer les acides nucléiques par précipitation alcoolique en présence d'éthanol ou d'isopropanol. Les paramètres de précipitation tels que volume d'alcool à ajouter, température, présence de cations monovalents ainsi que la récupération du matériel précipité sont détaillés dans de nombreux ouvrages accessibles à l'homme du métier. En particulier, la précipitation par l'isopropanol présente l'avantage de réduire encore la teneur en pigments, certains d'entre eux étant solubles dans la phase alcoolique.

Selon un mode préféré, le filtrat est en premier lieu concentré par ultrafiltration sur membrane polysulfone ayant un seuil de coupure d'environ 100 kDa à l'aide d'une unité de type Easy Flow (Sartorius) à usage unique ou sur membrane minipellicon 2 PL300 (Millipore) présentant un seuil de coupure d'environ 300 kDa. Une fois le volume réduit d'un facteur 5 à 20, les acides nucléiques sont précipités par addition de 0,7 volume d'isopropanol. Le matériel précipité est récupéré par centrifugation et peut être soumis à un ou plusieurs lavages dans l'éthanol à une concentration de 70 à 80 % afin de réduire les contaminants solubles dans l'alcool tels que les sels et, comme déjà mentionné, les pigments résiduels. Après séchage, les acides nucléiques sont repris dans un tampon approprié, par exemple du Tris-HCl 10 mM pH 8 contenant de l'EDTA à une concentration d'environ 1 mM pour inhiber les nucléases et de manière optionnelle de l'acétate de sodium (à une concentration finale d'environ 0,3 M permettant la précipitation des acides nucléiques après l'étape d'extraction au Triton). Il est intéressant de noter ici que les étapes d'ultrafiltration et de précipitation à l'isopropanol sont particulièrement avantageuses pour éliminer la majorité des pigments de la préparation.

A ce stade, la préparation d'ADN plasmidique contient des quantités importantes d'ARNs et d'endotoxines et les étapes suivantes consistent en une réduction de leurs taux. Par réduction, on entend une diminution notable du taux d'endotoxines ou d'ARN entre le début et la fin de l'étape, d'un facteur d'au moins 100 et, de préférence, d'au moins 1000. La concentration en ARN et endotoxines peut être appréciée par des essais semblables à ceux décrits ci-après ou par tout autre méthodologie divulguée dans la littérature. Bien que les étapes puissent être permutées, on préfère en premier lieu agir sur les endotoxines puis sur les ARNs.

Les endotoxines du fait de leur caractère pyrogène, doivent être considérablement réduites voire éliminées avant d'envisager une administration chez l'homme. En ce qui concerne les produits pharmaceutiques courants, la quantité maximale tolérable a été fixée par les autorités sanitaires à 5 unités (EU) par dose. Or, il a été montré que les procédés courants de préparation d'ADN plasmidique (ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium, chromatographie échangeuse d'anions, ...) laissent subsister de grandes quantités d'endotoxines (Cotten et al., 1994, *Gene Therapy* 1, 239-246).

Aux fins de la présente invention, on préférera avoir recours à une extraction en présence d'un détergent non ionique ayant un point nuage compris entre 15°C et 35°C, avantageusement 18°C et 30°C et, de préférence, 20°C et 25°C. Un détergent préféré est choisi parmi les polyoxyéthylènes. Des exemples de détergents utilisables selon la présente invention sont décrits dans le tableau suivant :

Détergent	Point nuage (°C)	Densité (20°C)	Formule	Fourn.
Brij58	45°C	-	$C_{16}H_{33} (OCH_2CH_2)_{20}OH$	ICI Americas
Triton™X-114	22°C	1,054	$(CH_3)_3C-CH_2-C(CH_3)_2-C_6H_4-(OCH_2CH_2)_{7.8}OH$	Sigma
Tergitol™ TMN6	37°C	1.009	$C_{12}H_{25} (OCH_2CH_2)_8OH$	Sigma
Tergitol™ NP7	41°C	1,048	$C_9H_{19}-C_6H_4-(OCH_2CH_2)_{7.8}OH$	Sigma
Tergitol™ Min-Foam 1X	40°C	0,995	$C_{11-15}H_{23-31}-O(CH_2CH_2O)_x$ $[CH_2CH_2O/CH_2CH(CH_3)O]_y$ $CH_2CH(CH_3)OH$	Sigma
Tergitol™ Min-Foam 2X	20°C	0,978	$C_{11-15}H_{23-31}-O(CH_2CH_2O)_x$ $[CH_2CH_2O/CH_2CH(CH_3)O]_y$ $CH_2CH(CH_3)OH$	Sigma

Les composés décrits précédemment sont des composés amphiphiles dont la miscibilité dans la phase aqueuse peut être contrôlée par variation de la température autour de leur point nuage. Avantageusement, selon le procédé de l'invention, la préparation d'ADN est refroidie à une température inférieure à 10°C avant d'ajouter ledit détergent. La concentration finale en détergent à utiliser peut être comprise entre 0,5 et 6%, avantageusement entre 1 et 5% et, de manière tout à fait préférée, aux environs de 1%. Dans ces conditions, ledit détergent est soluble dans l'eau et forme des micelles complexant les endotoxines. Après incubation et centrifugation du mélange ADN plasmidique / détergent à une température nettement supérieure au point nuage (par exemple >37°C dans le cas du Triton™ X-114), il y a séparation de deux phases : une phase aqueuse contenant l'ADN plasmidique et une phase contenant le détergent et les endotoxines. Lorsque le détergent choisi possède une densité supérieure à celle de la solution d'ADN, après séparation des phases par centrifugation, la phase aqueuse est localisée dans la partie supérieure du tube et la phase contenant le détergent et les endotoxines dans la partie inférieure, et inversement lorsque le détergent possède une densité inférieure à celle de la solution d'ADN. Pour des raisons techniques évidentes, on choisira de préférence un détergent ayant une densité supérieure à celle de la solution d'ADN. L'homme du métier dispose en outre des connaissances nécessaires lui permettant d'ajuster, si nécessaire, la densité de la solution d'ADN, en modifiant par exemple la concentration saline de ladite solution. Le procédé selon l'invention peut comprendre une ou plusieurs (de préférence 3) extractions successives telles que décrites ci-dessus.

Selon la présente invention, un détergent préféré est constitué par le Triton™ X-114 (octoxynol ou octylphenoxy-poly(éthylèneglycoéther)<sub>n</sub> avec n=7 ou 8) dont le point nuage est environ 20°C et la densité environ 1,06.

La présente invention concerne également une variante du procédé de l'invention selon laquelle le détergent non ionique choisi présente un point nuage situé en dehors de la gamme préconisée, et selon laquelle ladite température nuage est ajustée par l'addition d'une faible quantité d'un détergent anionique («Nonionic Surfactants», Chapter «Surfactant and Detersive Systems» in Kirk-Othmer Encyclopaedia of Chemistry, John WILEY & Sons, 1995).

Selon une variante intéressante du procédé selon l'invention, la réduction des endotoxines est suivie d'une étape de précipitation alcoolique de l'ADN plasmidique par incubation au froid (4°C, -20°C ou -80°C) en présence de 0,3 M d'acétate de sodium et environ 70 % d'éthanol. Le précipitat d'acide nucléique est récupéré classiquement par centrifugation. Il peut être lavé par une solution d'éthanol à 80 % dans l'eau avant d'être séché et redissous en milieu aqueux comme par exemple du Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM. Cette étape de précipitation, par ailleurs optionnelle, offre un moyen efficace d'éliminer les traces de Triton™ X-114 résiduel.

La réduction de la contamination par les ARN peut être réalisée par tout moyen connu de l'art, par exemple l'hydrolyse enzymatique au moyen d'une ribonucléase d'origine animale telle que la ribonucléase A pancréatique bovine. Mais, dans le cadre de la présente invention, on préfère avoir recours à une précipitation sélective des ARN dans des conditions de haute force ionique ou en présence d'agents déshydratants. Divers sels peuvent être utilisés et on mentionnera à titre indicatif, le chlorure de lithium (Zeev Lev, 1987, *Analytical Biochemistry* 160, 332-336), le chlorure de calcium, l'acétate d'ammonium et le sulfate d'ammonium. A ce titre, le sulfate d'ammonium constitue un mode de réalisation préféré, particulièrement à une concentration finale comprise entre 1 et 3,5 M, de préférence, entre 1,5 et 3 M et, de manière tout à fait préférée, entre 2 et 2,5 M. Selon une autre variante de l'invention, on peut utiliser du chlorure de calcium à une concentration finale comprise entre 10 mM et 2 M, avantageusement entre 20 mM et 0,5 M, et de manière préférée entre 50 mM et 0,1 M. D'une manière optimale, après l'ajout du sel ou de la solution saline, le mélange est laissé sous agitation faible, éventuellement à température basse, pendant une durée variable (1 à 120 min), centrifugé et l'ADN plasmidique récupéré dans le surnageant.

Le procédé selon l'invention comprend à ce stade une étape de chromatographie d'exclusion sur supports de gel filtration, qui permet de parfaire la purification de la préparation d'ADN plasmidique (réduction des ARNs et protéines résiduels) et également d'assurer le dessalage. Le choix du support est large et à la portée de l'homme de l'art. On retiendra plus particulièrement, les supports agréés pour un usage humain ou vétérinaire par les autorités compétentes américaines (FDA pour Food and Drug Administration) et/ou les

agences de l'Union Européenne et présentant une limite d'exclusion élevée et, notamment, supérieure ou égale à  $20 \times 10^6$  Da (telle que mesurée sur des polymères comme les dextrans). On peut citer par exemple les supports Séphacryl S500 HR (Pharmacia, référence 17-0613-01), S1000 SF (Pharmacia, référence 17-0476-01) et GF2000 (Biosepra, référence 260651).

5 Le support Séphacryl S500 est préféré dans le cadre de l'invention.

La colonne est initialement équilibrée dans des conditions salines limitant les interactions hydrophobes entre le support et l'ADN. Avantageusement, on utilise le tampon TEN (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, et NaCl 100 mM). Les conditions de chromatographie peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres et notamment  
10 du volume de la colonne, du support choisi, de la concentration de la préparation en ADN plasmidique et de la taille de ce dernier. L'ADN plasmidique est exclu de la phase et est élué avant les contaminants de poids moléculaire inférieur. Les fractions le contenant peuvent être analysées par les techniques usuelles (absorbance à 254 nm, analyse visuelle après séparation par électrophorèse en gel d'agarose ...). Il est également possible de connecter  
15 la colonne à un détecteur muni d'un filtre (à 254 nm par exemple) pour la détection en ligne des fractions positives. On notera qu'un avantage du procédé selon l'invention consiste en l'élimination au cours de cette étape, du sel résiduel issu de l'étape précédente.

Selon un mode de réalisation optionnel, les fractions obtenues après l'étape chromatographique peuvent être rassemblées et concentrées selon la méthodologie indiquée  
20 ci-avant (ultrafiltration et/ou précipitation alcoolique).

Enfin, le procédé selon l'invention comprend une étape de conditionnement de la préparation d'ADN plasmidique. Les tampons de conditionnement utilisables dans le cadre de la présente invention sont variés. Il peut s'agir d'une solution saline physiologique (NaCl 0,9 %), d'une solution Hepes-Ringer, de Lactate-Ringer, de TE (Tris-HCl 10 mM pH7,5 à  
25 8, EDTA 1 mM) ou simplement d'H<sub>2</sub>O. De manière optionnelle, la préparation peut être soumise à une filtration stérilisante. On aura avantageusement recours à des filtres de 0,22 µm d'une surface adaptée au volume à traiter. On peut citer, par exemple, les unités de filtration de type Minisart (Sartorius, référence SM16534), Sartolab P20 (Sartorius, référence 18053D), Millex GF (Millipore, référence SLGS025BS), Millex GV (Millipore, référence SLGV025BS), Millex GP (Millipore, référence SLGPR25LS), Anotop 25  
30



(Whatman, référence 20025H-68092122), Anotop 25 Plus (Whatman, référence 2002AP-68094122), Sartobran 300 (référence 5231307H5p00V) ou Easy Flow 0,2  $\mu$ m en acétate de cellulose (référence 12307-05-1-V). Puis, le filtrat est conditionné en doses ajustées à une concentration donnée.

5           La concentration en ADN plasmidique peut être déterminée de manière conventionnelle, par exemple par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260 nm. La proportion relative des différents topoisomères peut être évaluée visuellement par électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium éventuellement suivies d'une analyse densitométrique. L'intégrité du plasmide peut être vérifiée par digestion par  
10 des enzymes de restriction ayant un ou plusieurs sites de coupure.

          La qualité de l'ADN plasmidique préparé par le procédé selon l'invention peut être appréciée par des essais standards tels que ceux qui sont décrits dans les exemples qui suivent. La contamination en ARN peut être évaluée visuellement par électrophorèse en gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium ou par spectrophotométrie après réaction à  
15 l'orcinol chlorhydrique (réactif de Bial) (Moulé, 1953, Arch. Science Physiol. 7, 161 ; Mejbaum, 1939, Hope Seyler Z. 258, 117). Un ADN plasmidique purifié selon le procédé de l'invention présente de préférence une contamination résiduelle en ARN inférieure à 5 % (masse/masse), avantageusement inférieure à 3 %, de préférence inférieure à 2 % et, de manière tout à fait préférée, inférieure à 1 %.

20           La contamination résiduelle par les protéines peut être mesurée par toute technique de dosage des protéines ne montrant pas ou peu d'interférences dues à l'ADN. Une technique adéquate est celle de la technique du BCA (acide bicinchoninique) basée sur la détection spectrophotométrique à une longueur d'onde de 562 nm du complexe coloré formé entre le BCA et les ions  $\text{Cu}^+$  issus de la réduction en milieu alcalin d'ions cuivreux  $\text{Cu}^{++}$  par  
25 les protéines (Smith et al., 1985, Anal. Biochem. 150, 76-85). Un ADN plasmidique purifié selon le procédé de l'invention présente de préférence une contamination résiduelle en protéines inférieure à 3 % (masse/masse), avantageusement inférieure à 2 %, de préférence inférieure à 1 % et, de manière tout à fait préférée, inférieure à 0,5 %.

          Les techniques de dosage des endotoxines sont connues de l'homme du métier. On  
30 peut par exemple procéder par un essai colorimétrique dérivé de la méthode du LAL (Limulus Amebocyte Lysate) recommandée par les pharmacopées de l'Union Européenne

et des Etats Unis, tel qu'il est mis en oeuvre dans les kits commerciaux (Bio-Whittaker, QCL-1000, référence L50-647-U ; Biogenic, COATEST, référence 82 2387). De préférence, la quantité d'entoxines de la préparation d'ADN plasmidique est inférieure à 50 EU, avantageusement inférieure à 20 EU, de préférence inférieure à 10 EU et, de manière  
5 tout à fait préférée, inférieure à 5 EU par mg de plasmide.

L'ADN chromosomique contaminant peut être dosé par la technique de PCR quantitative compétitive basée sur l'amplification de séquences spécifiques du microorganisme producteur, par Southern ou encore par "Slot-blot" à l'aide d'une sonde spécifique. Un ADN plasmidique purifié selon le procédé de l'invention présente de  
10 préférence une contamination résiduelle en ADN chromosomique inférieure à 5 % (masse/masse), avantageusement inférieure à 3 %, de préférence inférieure à 2 % et, de manière tout à fait préférée, inférieure à 1 %.

Un procédé selon l'invention est particulièrement avantageux pour ce qui est de la préparation d'ADN plasmidique de taille supérieure à 10 kb.

15 La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant un ADN plasmidique purifié par le procédé selon l'invention à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique. Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être utilisée dans divers types de cellules hôtes. Il s'agit de préférence d'une cellule de mammifère et, en particulier d'une cellule humaine. Ladite cellule peut être une cellule primaire ou tumorale  
20 d'une origine hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte, macrophage, ...), hépatique, épithéliale, fibroblaste et, tout particulièrement, une cellule musculaire (myoblaste, myocyte, cellule satellite, cardiomyocyte, ...), une cellule trachéale ou pulmonaire. Par ailleurs, une composition selon l'invention peut comprendre un élément de ciblage vers une cellule particulière, par exemple un ligand à un récepteur cellulaire ou  
25 encore un anticorps. De tels éléments de ciblage sont connus.

Une composition selon l'invention peut être administrée par voie systémique ou par aérosol, en particulier par voie intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, intratumorale intrapulmonaire, intranasale ou intratrachéale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un  
30 certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu ou de la maladie à traiter ou encore du ou

des gène(s) d'intérêt à transférer. En particulier, une composition pharmaceutique selon l'invention peut être formulée sous forme de doses comprenant entre 0,05 et 100 mg d'ADN plasmidique purifié selon le procédé selon l'invention, avantageusement 0,1 et 10 mg et, de préférence, 0,5 et 5 mg. La formulation peut également inclure d'autres composés tels qu'un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

Dans ce contexte, il peut être particulièrement avantageux d'associer l'ADN plasmidique à un composé améliorant sa diffusion, notamment un polymère ou un lipide cationique. A titre d'exemples, on mentionnera le 5-carboxyspermylglycine dioctadecylamide (DOGS), le 3 $\beta$  ([N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl] cholestérol (DC-Chol), le (2,3-diolelylocyl-N-[2(spermincarboxamido) éthyl] N, N-diméthyl-1-propanaminium trifluoroacétate) (DOSPA), la spermine cholestérol et la spermidine cholestérol (décrits dans la demande française 96 01347).

Par ailleurs, une telle composition peut en outre comprendre un adjuvant capable d'améliorer son pouvoir transfectant. Il s'agira de préférence d'un lipide neutre tel que les phosphatidyl éthanolamine, phosphatidyl choline, phosphatidyl sérine, phosphatidyl glycérol et, en particulier, la diolelyl phosphatidyl éthanolamine (DOPE). Il est également possible de combiner au complexe ADN plasmidique/lipide d'autres substances pour améliorer encore l'efficacité transfectionnelle ou la stabilité des complexes.

Une composition selon l'invention est en particulier, destinée au traitement préventif ou curatif de maladies telles que maladies génétiques (hémophilie, mucoviscidose, diabète ou myopathies de Duchenne et de Becker, ...), cancers, maladies virales (hépatites, SIDA, ...), et maladies récurrentes (infections provoquées par le virus de l'herpès, le virus du papilloma humain, ...).

Enfin, la présente invention est relative à l'utilisation thérapeutique ou prophylactique d'une composition pharmaceutique selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal et, préférentiellement, par thérapie génique. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, intramusculaire, dans une tumeur accessible, dans les poumons par aérosol, ...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires, ...), de les transfecter *in vitro* selon les techniques de l'art

et de les réadministrer au patient.

L'invention s'étend également à une méthode de traitement mettant en oeuvre un ADN plasmidique obtenu par un procédé selon l'invention, selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace de ce dernier à un patient ayant besoin d'un tel traitement.

La présente invention est plus complètement décrite en référence aux figures suivantes :

La Figure 1 illustre un chromatogramme après gel filtration sur Séphacryl S500 (colonne de 70 ml de diamètre 16 mm et longueur 350 mm) et chargement d'un échantillon de 2 ml contenant 5 mg de pCH110N obtenu après lyse alcaline, ultrafiltration et traitement au sulfate d'ammonium. L'élution est effectuée à 0,5 ml/min (15 cm/h) dans un tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0. La densité optique est enregistrée à 254 nm.

La Figure 2 est une représentation schématique du vecteur pTG11025 comportant le gène conférant la résistance à la kanamycine (kana), l'origine de réplication de ColE1, le promoteur CMV (pCMV) du cytomégalovirus, l'intron du gène codant pour l'Hydroxy-Méthylglutaryl-Coenzyme A Reductase (HMG), l'ADNc codant pour la dystrophine et une séquence de polyadénylation des ARNs transcrits (pA).

La Figure 3 illustre un chromatogramme après gel filtration sur Séphacryl S500 (colonne de 5 litres de diamètre 8,9 cm et de longueur 82 cm) et chargement de 125 ml d'échantillon contenant 85 mg de pTG11025. L'élution est effectuée à environ 15 ml/min (14,5 cm/h) dans un tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0.

La Figure 4 illustre l'élimination progressive des endotoxines d'un lysat alcalin par 3 extractions successives avec 1 % ou 3 % de Triton™ X-114 suivies d'une précipitation à l'éthanol.

La Figure 5 illustre la précipitation sélective des ARNs contaminants d'un lysat alcalin en présence de molarités croissantes de sulfate d'ammonium (0 à 3,2 M final).

La Figure 6 illustre la précipitation sélective des ARNs contaminants d'un lysat alcalin en présence de molarités croissantes de chlorure de calcium (10 à 100 mM). La molarité finale en CaCl<sub>2</sub> est indiquée sous les lignes concernées. S = dépôt d'une fraction

de l'échantillon de matériel soluble obtenu après traitement par le  $\text{CaCl}_2$  ; l. = dépôt d'une fraction de l'échantillon de matériel insoluble obtenu après traitement par le  $\text{CaCl}_2$  ; oc = ADN plasmidique de forme circulaire (open circle) ; sc = ADN plasmidique de forme surenroulée (super coiled) ; a = ARNs.

5 Les exemples qui suivent n'illustrent qu'un mode de réalisation de la présente invention.

### EXEMPLES

10 Les solutions définies ci-après ont été préparées à partir de solutions mères ou produits chimiques obtenus commercialement.

EXEMPLE 1 : Purification du plasmide pCH110N à partir de la souche *E. coli* MC1061 transformée.

15

#### *1. Préparation et amplification des cellules recombinantes*

On a recours à la souche *E. coli* MC1061 (Wertman et al., 1986, *supra*) et au plasmide pCH110N. Il s'agit d'un plasmide de 8,5 kb dont le maintien dans *E. coli* est assuré  
20 par une origine de replication (ColE1) et un gène de résistance à l'ampicilline, tous deux issus de pBR322. Le gène d'intérêt est constitué par le gène reporter  $\beta$ -galactosidase d'*E. coli* dont l'expression peut être facilement détectée par coloration au X-Gal (4-chloro-5-bromo-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside). Il est muni dans sa partie 3' d'une séquence codant pour un signal de localisation nucléaire eucaryote. La localisation nucléaire de la  $\beta$ -  
25 galactosidase recombinante permet de s'affranchir des problèmes de bruits de fond engendrés par la réaction croisée avec la  $\beta$ -galactosidase endogène de la cellule hôte également détectable par le Xgal, et donc d'assurer une détection spécifique de l'activité enzymatique résultant du plasmide transfectée. L'expression du gène reporter est dirigée par le promoteur précoce de SV40.

30

Les cellules MC1061 sont rendues compétentes par traitement au chlorure de calcium et transformées par le plasmide pCH110N. Les bactéries recombinantes sont sélectionnées en milieu sélectif. On choisit un clone par examen des profils de restriction à partir duquel on constitue un stock glycérol primaire.

5       Après inoculation d'une préculture en fiole, celle-ci est utilisée pour ensemer un fermenteur. La fermentation a été conduite en continu (batch) dans 18 litres d'un milieu LB 2 fois concentré (LB2x) sans ajout de substrat carbonné, à 37°C et en présence d'ampicilline (100 µg/ml). La culture est recueillie après 2 heures en phase stationnaire. Dans ces conditions et pour une densité optique finale  $DO_{600}$  de 7,5, on obtient 180 g de biomasse  
10   totale.

### *2. Récolte de la biomasse cellulaire humide*

Le contenu du fermenteur est réparti dans des pots de centrifugation propres et  
15   stériles (Nalgène, ref 3122-1000, 3122-1010, 3120-1000 ou 3120-1010) et les cellules transformées récupérées par centrifugation à faible vitesse (5000 rpm (tours par min) pendant 30 min) et à 4°C. On peut employer une centrifugeuse Sorvall RC3 munie d'un rotor H6000-A ayant une capacité de 6x1 litre et procéder à trois centrifugations successives dans les mêmes pots afin de récolter la totalité de la culture. Après élimination du milieu, le  
20   poids des culots cellulaires est estimé par pesée et ceux-ci peuvent être congelés à -20°C avant d'être traités par le procédé détaillé ci-dessous. Les cellules ainsi récoltées constituent la biomasse cellulaire humide.

### *3. Préparation du lysat acidifié*

25       Le culot congelé est fragmenté et on prélève à l'aide d'une spatule la quantité de biomasse que l'on désire traiter. Par la suite, les volumes des solutions utilisées sont données pour 27 g de biomasse humide. Les cellules sont reprises dans 320 ml de tampon de resuspension (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8) préalablement équilibré à 4°C et  
30   remises en suspension à l'aide d'un homogénéisateur par cisaillement (Ultra Turrax-25 muni

d'une sonde de diamètre 18 mm) avant d'être lysées en présence de 320 ml de tampon de lyse (1 % SDS, 0,2 M NaOH) équilibré à 20°C. On laisse la lyse se poursuivre 5 min à température ambiante en agitant doucement la préparation par inversion puis on ajoute 320 ml de solution acide ( $\text{CH}_3\text{COOK}$  3 M pH 5,5) équilibrée à 4°C. Le lysat cellulaire acidifié  
5 est laissé 20 min à 0°C en procédant régulièrement à des agitations douces par inversion. Le pH final est de 5,1.

#### *4. Elimination des insolubles et concentration du filtrat*

10 Le floculat est tout d'abord éliminé grossièrement par centrifugation à faible vitesse (5000 rpm pendant 30 min à 4°C dans un rotor GSA, Sorvall). Le surnageant est soumis à deux filtrations successives sur frittés de porosité contrôlée (16 à 40  $\mu\text{m}$  puis 10 à 16  $\mu\text{m}$ ; frittés N° 3 et 4 ; Schott AG) à l'aide d'une fiole à vide connectée à une trompe à eau ou une source de vide équivalente.

15 Le filtrat est soumis à une étape de concentration par ultrafiltration sur cartouche Easy Flow (Sartorius) munie d'une membrane de polysulfone d'un seuil de coupure de 100 kDa (Sartorius, 0,1  $\text{m}^2$  référence 14669-OS-1-V ou 0,2  $\text{m}^2$  référence 14669-OS-2-V selon le volume à traiter). La cartouche est reliée à une pompe péristaltique et le débit de recirculation appliqué est d'environ 400 ml/min. L'ultrafiltration est effectuée jusqu'à ce que  
20 le volume final soit réduit d'un facteur 8 à 16. On travaille à température ambiante afin de réduire la durée de l'opération.

Les acides nucléiques contenus dans le filtrat sont précipités par ajout de 0,7 volume d'isopropanol maintenu à 20°C. Le mélange est homogénéisé par retournements successifs, incubé 5 min à température ambiante et le précipité collecté par centrifugation à 10 000 rpm  
25 pendant 30 min à 4°C (rotor GSA, Sorvall). Après élimination du surnageant, le culot d'acides nucléiques est lavé 2 fois de suite par 50 ml d'une solution d'éthanol à 80 % dans l'eau (équilibrée à environ -20°C) et à nouveau récupéré par centrifugation à 10 000 rpm pendant 15 min à 4°C.

*Extraction des endotoxines*

Le culot est séché et dissous dans 18 ml d'une solution d'acétate de sodium ( $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,3 M dans du Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) et conservé une trentaine de minutes à 0°C. On ajoute 2 ml d'une solution de Triton™ X-114 (Sigma ; référence X-114™) à 10 % (poids/volume) dans  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,3 M à pH 5,5 (concentration finale en Triton 1%) et le mélange est homogénéisé par agitation manuelle. Après incubation 10 min sur glace puis 25 min à 52°C, la phase inférieure obtenue après centrifugation (rotor SLA 1500, Sorvall) à 10 000 rpm pendant 10 min à 35°C est prélevée et éliminée. On procède à deux extractions supplémentaires dans les mêmes conditions en présence de 2,2 ml et 2,4 ml de Triton™ X-114 respectivement. La phase supérieure est précipitée par ajout de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -20°C. Après incubation au moins 45 min à -20°C, le précipitat est récupéré par centrifugation à 10 000 rpm (rotor SLA 1500, Sorvall) pendant 30 min et à 4°C et soumis à 1 ou 2 lavages successifs par une solution d'éthanol à 80 % dans l'eau conservée à -20°C. Le culot de centrifugation peut être congelé avant de procéder à la prochaine étape.

*Elimination des ARNs*

Le culot de centrifugation est séché sous vide et repris dans 9,4 ml de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8 à température ambiante. On ajoute du sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solide de manière à avoir une concentration finale d'environ 2 M. Après mélange par inversion et incubation 20 min sur glace, on centrifuge 30 min à 7 000 rpm (rotor SLA 1500, Sorvall) et à 4°C. Une deuxième centrifugation dans des conditions identiques est effectuée sur le surnageant récupéré de la première afin de parfaire l'élimination des insolubles.

*Chromatographie sur Séphacryl S500*

Le surnageant de centrifugation est soigneusement prélevé et soumis à une



chromatographie de gel filtration sur matrice Séphacryl S500 (Pharmacia ; référence 17-0613-01). Dans les conditions précitées, on utilise une colonne ayant une capacité de 1 litre (longueur 622 mm, diamètre 44 mm) développée à 3,8 ml/min (15cm/h) mais, bien entendu l'homme du métier est capable d'adapter la capacité de la colonne en fonction du volume à  
5 traiter.

La colonne est équilibrée dans 2 volumes de TEN avant d'appliquer un volume d'échantillon d'acides nucléiques représentant 4 à 5 % du volume de celle-ci. La collecte et la détection des fractions sont automatisées (collecteur de fractions LKB 2212 et détecteur LKB 2158 Uvicord SD muni d'un filtre à 254 nm). Les fractions de 3 min sont prélevées et  
10 congelées avant d'être analysées. La Figure 1 illustre un chromatogramme obtenu à plus petite échelle mais représentatif du procédé. L'ADN plasmidique sort dans le volume d'exclusion alors que ARN et protéines sont retenus et n'apparaissent que plus tardivement. On notera la nette séparation, avec un retour pratiquement à la ligne de base, obtenue entre le pic d'ADN plasmidique élué en premier et le pic d'ARNs élué en second.

15

#### *Conditionnement*

Les fractions contenant l'ADN plasmidique sont regroupées et concentrées environ 8 x à l'aide d'une unité d'ultrafiltration de type Sartocon-Micro à membrane de polysulfone  
20 ayant un seuil de coupure de 100 kDa (Sartorius, référence 15669-00-1). Alternativement, et lorsque une plus grande quantité d'échantillon doit être traitée, on peut employer une unité d'ultrafiltration EasyFlow à membrane d'acétate de cellulose (20 kDa de seuil de coupure, Sartorius, référence 14549-0S-1V).

Après concentration, l'échantillon d'ADN plasmidique purifié est précipité par ajout  
25 d'une solution d'acétate de Na (3 M, pH 5,5) jusqu'à la concentration finale de 0,3 M et addition de 2,5 volumes d'éthanol pur (99,95 %) à -20°C. Après incubation à -20°C (30 min), l'ADN plasmidique est récupéré par centrifugation à 10 000 rpm pendant 30 min à 4°C (rotor SLA 1500, Sorvall). Le culot est lavé par l'éthanol à 80 % à environ -20°C, puis séché et repris dans le tampon de conditionnement adéquat (TE, 0,9 % NaCl, Hepes Ringer,  
30 Lactate Ringer, H<sub>2</sub>O ; environ 20 ml par aliquote de 27 g de cellules traitées).

Après mesure de la densité optique à 260 nm, la concentration en ADN est calculée en prenant pour base une  $DO_{260}$  correspondant à 50  $\mu\text{g/ml}$ . Elle peut alors être ajustée à 1,0 mg/ml par dilution avec le tampon de conditionnement, et on obtient typiquement environ 20 mg d'ADN plasmidique par aliquote de 27 g de biomasse initiale.

5

**EXEMPLE 2 :**      Purification du plasmide pTG11025 à partir de la souche *E. coli* DH10B transformée.

10            La souche *E. Coli* DH10B Electro Max est fournie par Gibco BRL (Référence 18290-015). Le plasmide pTG11025 (Figure 2) de 18,7 kb porte un gène marqueur qui confère aux bactéries la capacité de résistance à la kanamycine (gène codant pour une aminoglycoside 3' phosphotransférase transformant l'antibiotique en dérivé inactif) et l'origine de répllication ColE1, ces deux éléments assurant le maintien du plasmide dans la  
15 souche productrice. Il comporte en outre une cassette d'expression de l'ADNc codant pour la dystrophine sous le contrôle du promoteur CMV associé à l'intron HMG.

Les cellules DH10B compétentes sont transformées par le plasmide dans les conditions préconisées par le fournisseur et on constitue un stock glycérol primaire conservé à -80°C après sélection d'un clone recombinant. Un lot de semence primaire est utilisé pour  
20 constituer une préculture en fiole sur milieu LB2x en présence de kanamycine 50 $\mu\text{g/ml}$ . La culture est incubée à 30°C dans un agitateur thermostaté (180 rpm) pendant 14 à 16 heures.

Après transfert de la préculture en fiole d'ensemencement, la souche transformée est propagée dans un fermenteur de 20 litres. La croissance est effectuée à 30°C dans un milieu de culture complexe (Hycase SF 37,5g/l, Yeast Extract 9g/l supplémenté en facteurs de  
25 croissance et sels minéraux) utilisant le glycérol à titre de substrat carboné (20 g/l) et en présence de kanamycine (50  $\mu\text{g/ml}$ ) pour la pression de selection. Le pH = 7,0 est régulé par addition automatique de soude (NaOH, 30%) et d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2 M). L'oxygène dissous est maintenu à une saturation supérieure ou égale à 25 % (taux d'aération de 1 v.v.m (10 l mn<sup>-1</sup>) et une vitesse d'agitation variable. Il peut être avantageux d'ajouter de la  
30 kanamycine en cours de culture.

La culture est stoppée par refroidissement à 4°C lorsque les bactéries atteignent la phase stationnaire de croissance. La culture est soutirée et la biomasse récoltée par centrifugation (centrifugeuse Sorvall RC3B, 15 min, 4°C, 5000 rpm). Le culot de cellules est conservé à -20°C jusqu'à la mise en application du procédé de purification du plasmide pTG11025.

Celui-ci est similaire au procédé décrit à l'exemple 1, à l'exception des modifications suivantes :

- La purification est effectuée à partir de 360 g de biomasse humide reprise dans 3840 ml de tampon de resuspension et lysée par un volume équivalent de tampon de lyse puis de solution acide.
- Les insolubles sont éliminés par filtration sur Fritté N° 4 (16-10 µm, Schott AG) avant concentration 15 fois sur Easy Flow.
- Le filtrat est séparé en 6 aliquotes. La précipitation à l'isopropanol, les lavages à l'éthanol 80 %, les étapes d'extractions des endotoxines par le Triton™ X-114, la précipitation à l'éthanol et les lavages à l'éthanol 80 % subséquents sont réalisés sur chacune des aliquotes comme décrit à l'exemple 1.
- Les échantillons sont regroupés pour la précipitation au sulfate d'ammonium à une molarité finale de 2 M.
- Le surnageant de centrifugation récolté après l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium est chargé sur une colonne de gel filtration de Séphacryl S500 d'un volume de 5 litres (longueur 82 cm, diamètre 8,9 cm) développée à un débit de 15 ml/min (14,5 cm/h). Le chromatogramme obtenu (Figure 3) montre que l'ADN plasmidique est élué dans le volume d'exclusion, alors que les ARNs contaminants et autres composés de petits poids moléculaires sont retenus sur la colonne.
- Les fractions contenant l'ADN plasmidique purifié sont regroupées et concentrées par ultrafiltration (facteur 10,9). L'ADN plasmidique est alors précipité par ajout d'acétate de sodium à une concentration finale de 0,3 M et de 2,5 volumes d'éthanol 99,95 % à -20°C.
- Le précipité est collecté par centrifugation (10 000 rpm à 4°C, rotor SLA 1500

Sorvall, 30 min) et lavé par 200 ml d'éthanol à 80 %.

- Après séchage sous vide, l'ADN est repris dans le tampon de conditionnement TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5), sa concentration mesurée par spectrométrie UV et ajustée à 1 mg/ml dans le même tampon. On obtient typiquement 145 mg d'ADN plasmidique purifié.

L'intégrité du plasmide est évaluée par cartographie par enzymes de restriction et les profils obtenus correspondent à ce qui est attendu. Par ailleurs, la présence de contaminants est également déterminée dans la préparation finale et les résultats présentés ci-dessous.

Contaminant	Méthode	Résultat
Protéines	BCA	0,49 % (n=3)
RNA	Réaction colorimétrique de Bial	2,48 % (n=3)
Endotoxine	Méthode colorimétrique LAL	2,34 UE/mg (n=5)

Par ailleurs, la fonctionnalité du plasmide pTG11025 purifié est vérifiée par transfection de lignées cellulaires et mise en évidence de la dystrophine recombinante par immunofluorescence.

Dix µg d'ADN plasmidique purifiés sont combinés à 40 µg de Lipofectine (un mélange de composés facilitant la transfection de cellules eucaryotes) suivant les instructions du fournisseur (Life Technologies, Bethesda, USA, référence 18292-0011), puis sont ajoutés, dans 2 ml de milieu DMEM (Life Technologies, Bethesda, USA, référence 11963), à  $2,5 \times 10^6$  cellules A549 (adénocarcinome pulmonaire humain)ensemencées la veille dans une boîte de diamètre 35 mm, cultivées 24 heures en présence de milieu DMEM supplémenté par 10 % (vol/vol) de sérum de veau foetal (Life Technologies, Bethesda, USA, référence 10101-061) et préalablement rincées par un tampon physiologique (PBS

lx). Quatre heures après ajout de l'ADN, le milieu est complété par 10 % (vol/vol) de sérum de veau foetal, puis la culture est poursuivie 48 heures. Les cellules sont ensuite fixées par traitement à -20°C dans un mélange méthanol/acétone (1/1) (vol/vol), séchées à l'air, et incubées en présence d'abord d'un anticorps monoclonal de souris antidystrophine (Novocastra, Newcastle/Tyme, UK, référence NCL-DYS2) puis d'un anticorps de lapin anti-souris (ICN, Costa Mesa, USA, référence 651713) couplé au FITC (fluorescéine thio-isocyanate) ; les conditions détaillées de ces opérations sont connues de l'homme de l'art. La dystrophine produite lors de l'expression du gène codé par le vecteur pTG11025 est détectée par examen en microscopie de fluorescence des complexes immuns. L'examen simultané de cellules transfectées en présence d'un plasmide pTG11025 contrôle de fonctionnalité déjà démontrée purifié selon un protocole standard (Maniatis et al., 1989, *supra*) (témoin positif) ou en absence d'ADN (témoin négatif) permet d'évaluer le caractère fonctionnel de la préparation d'ADN plasmidique pTG11025. Le taux de cellules fluorescentes exprimant la dystrophine recombinante est comparable après transfection par le pTG11025 contrôle et par le plasmide purifié par le procédé selon l'invention. Bien entendu, les cellules non transfectées ne montrent aucune fluorescence.

**EXEMPLE 3 :**      Elimination des endotoxines par le Triton™ X-114.

Des essais d'extractions au Triton™ X-114 ont été menés sur un lysat alcalin tel qu'obtenu à l'exemple 1 afin de déterminer les concentrations optimales de Triton™ X-114 à mettre en oeuvre et le nombre d'extractions à réaliser pour réduire le taux d'endotoxines en dessous du seuil toléré ( $\leq 2$  UE / dose).

Pour ce faire, le lysat alcalin initial est réparti en 2 lots soumis à 3 extractions consécutives en présence de Triton™ X-114 à une concentration finale de 1 et 3 % respectivement. Le mélange est homogénéisé, incubé sur glace (0°C) quelques minutes, centrifugé 5 minutes (12000 rpm, centrifugeuse Eppendorf, référence 5414) à température ambiante. Après centrifugation, la phase inférieure (Triton™ X-114 et endotoxines extraites)

de chaque lot est éliminée, et la phase aqueuse supérieure (Extr. 1 ; acides nucléiques et endotoxines restantes) traitée à nouveau comme décrit par 1 % ou 3 % de Triton™ X-114 après prélèvement d'une aliquote servant au dosage des endotoxines (Extr.2 et 3). Après la troisième extraction, la phase supérieure est précipitée par ajout de 2,5 volumes d'éthanol absolu. Le précipitat est repris dans du Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8 (Final).

Le taux d'endotoxines est dosé par un essai colorimétrique dérivé de la méthode LAL, à l'aide du kit Biogenic COATEST (référence 822387) et les résultats présentés dans la Figure 4. On observe une réduction notable du taux d'endotoxines après deux extractions en présence de Triton 1 %. Un résultat similaire est obtenu lorsque 3 % de Triton™ X-114 sont utilisés. Dans les 2 cas, le taux d'endotoxines mesuré dans le produit final est compatible avec une utilisation pharmaceutique pour une dose moyenne de 1 mg d'ADN plasmidique.

**EXEMPLE 4 : Précipitation selective des ARNs contaminants.**

Des essais de précipitation selective ont été menés sur un lysat alcalin tel qu'obtenu à l'exemple 1 afin de déterminer les concentrations optimales en sulfate d'ammonium pour précipiter les ARNs contaminants. Pour ce faire, le lysat alcalin est réparti en 7 aliquotes soumises à une précipitation en présence de quantité croissante de sulfate d'ammonium (0,5 M, 1 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M, 3 M et 3,2 M final).

Le matériel précipité récupéré par centrifugation et le matériel soluble sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,4 %. Après coloration au bromure d'éthidium et révélation par fluorescence UV, l'ADN plasmidique apparaît sous forme de bandes nettes correspondant aux différents topoisomères. Au contraire, les ARNs forment une bande très diffuse migrant dans la partie inférieure du gel.

Les résultats illustrés dans la Figure 5 montrent qu'au-delà d'une concentration finale de 1,5 M en sulfate d'ammonium, la très grande majorité des ARNs se trouve sélectivement précipitée alors que l'ADN plasmidique reste soluble. On notera également l'élimination dans le précipité d'espèces d'acides nucléiques de grande taille retenues dans les poches du gel

d'analyse.

**EXEMPLE 5 :**      Précipitation sélective des ARNs contaminants au chlorure de calcium.

5  
La précipitation sélective des ARNs a également été testée en présence de chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ). Un lysat alcalin préparé selon la méthode décrite dans l'exemple 1, incluant l'étape de traitement au Triton™ X-114, a été aliquoté en échantillons identiques auxquels différents volumes d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  concentrée (1M dans ce cas précis, 10  
mais une solution moins concentrée, 0.5M par exemple, peut être utilisée) sont ajoutés afin d'obtenir une concentration finale en chlorure de calcium de 10, 20, 30, 50, 75 ou 100 mM, respectivement. Les fractions solubles et insolubles sont séparées par centrifugation, et le culot d'insoluble est resuspendu dans un tampon de faible force ionique en absence de  $\text{CaCl}_2$ . Les échantillons solubles et insolubles sont analysés par électrophorèse sur gel  
15 d'agarose et coloration au bromure d'éthidium d'une fraction d'échantillon afin de séparer l'ADN plasmidique (formes circulaire ouverte et surenroulée) et les ARNs contaminants.

Les résultats (Figure 6) montrent qu'au-delà d'une concentration de 30 mM en  $\text{CaCl}_2$  une précipitation détectable des ARNs est observée. Cette précipitation devient  
20 importante puis massive au delà de 50 et 75 mM respectivement, puis quasi totale à 100 mM. L'ADN plasmidique sous ses formes circulaire ouverte (Open-Circle, migrant le moins rapidement) et surenroulée (Super-Coiled, migrant le plus rapidement) demeure pour sa part majoritairement soluble dans chacun des cas.

25

**EXEMPLE 6 :**      Elimination des pigments colorés.

L'efficacité d'élimination des pigments colorés présents après l'étape de lyse alcaline (cf. Exemples 1, 2 et 5) a été évaluée au cours des étapes de concentration par  
30 ultrafiltration, de précipitation par l'isopropanol et de lavage par l'éthanol à 80 %.

La présence de ces pigments se traduit par une coloration jaune du lysat alcalin brut avant sa concentration par ultrafiltration qui peut être analysée par mesure de la densité optique à 340 nm. Cette absorbance a donc été mesurée sur les échantillons obtenus après les étapes d'ultrafiltration initiale, de précipitation et de lavage par l'isopropanol et par l'éthanol à 80%. Deux séries d'expériences ont été réalisées, l'une mettant en jeu la filtration du lysat alcalin sur fritté de verre, l'autre sur cartouche de polypropylène Sartopure PP. Les lysats initiaux sont obtenus à partir de 150 g d'une biomasse cellulaire issue de deux fermentations du couple *E. coli* souche DH5 x plasmide pTG11025 (~19 kbp).

10

Expérience N°1 : Macrofiltration réalisée sur fritté de verre N° 3 (16 à 40 µm de porosité - Schott AG

15

Etape	Volume final (ml)	Densité Optique à 340 nm	Rendement cumulé en pigments	Facteur d'élimination cumulé (X)
Lysat brut initial	5340 ml	0,29	100 %	1 X
Post macrofiltration	5260 ml	0,28	95,1 %	1,1 X
Post concentration par ultrafiltration (Easy- Flow 300kDa, Sartorius)	795 ml	0.38	19,5 %	5,1 X
Post précipitation alcoolique	432 ml	0.39	10,1 %	9,2 X



Expérience N°2 : Macrofiltration réalisée sur cartouche SartopurePP2 ( 8 mm de porosité - Sartorius)

Etape	Volume final (ml)	Densité Optique à 340 nm	Rendement cumulé en pigments	Facteur d'élimination cumulé (X)
Lysat brut initial	5200 ml	0.32	100 %	1 X
Post macrofiltration	5000 ml	0.31	93,1 %	1,1 X
Post concentration par ultrafiltration (Easy-Flow 300kDa, Sartorius)	790 ml	0.57	27,0 %	3,7 X
Post précipitation alcoolique	432 ml	0.62	16,1 %	6,2 X

5

Ces résultats montrent que les étapes d'ultrafiltration et de précipitation à l'isopropanol contribuent à l'élimination des pigments d'un facteur 4 à 5 x et 1,5 à 2 x, respectivement. Combinées, ces deux étapes permettent d'atteindre un facteur d'élimination de 6 à 10 X, soit une élimination totale de 80 à 90% des pigments colorés.

10

**EXEMPLE 7 :** Purification du plasmide pTG11025 à partir de la souche *E. coli* DH5 Library Efficiency.

La souche *E. coli* DH5 Library Efficiency ( Life Technologies ; réf. 18262-014) est transformée avec le plasmide pTG11025 (voir exemple 2 et figure 2). Les étapes de

15

transformation, de préparation et de récolte de la biomasse sont identiques à celles décrites dans l'exemple 2.

Le lysat brut est filtré sur une cartouche de filtration Sartopure PP2 (Sartorius, réf. 5591302P9--0) sous un débit de 700 ml/min à l'aide d'une pompe péristaltique. Le filtrat  
5 est ensuite concentré par ultrafiltration sur une membrane Millipore Minipellicon II en cellulose régénérée de type PL300 de surface 0,1 m<sup>2</sup> (réf. P2C300C01) (débit de recirculation ~400 ml/min., débit de soutirage compris entre 60 et 30 ml/min. de façon à maintenir une pression transmembranaire moyenne inférieure ou égale à 0,5.10<sup>5</sup> Pa).

Les acides nucléiques ainsi concentrés (815 ml) sont traités à l'isopropanol et à  
10 l'éthanol comme précédemment décrit dans l'exemple 2. Les endotoxines sont éliminées par trois extractions successives au Triton™ X-114. Les acides nucléiques sont précipités. Les sels et le détergent non ionique résiduels sont rincés à l'aide d'éthanol aqueux.

Les acides nucléiques sont repris dans un tampon Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5 et les ARNs sont spécifiquement précipités en présence de CaCl<sub>2</sub> 100 mM final. Ces ARNs  
15 sont éliminés par centrifugation (10000 r.p.m., rotor Sorvall, SLA1500, température 20°C, 40 min.). L'ADN plasmidique présent dans la phase soluble est précipité par addition d'isopropanol et resolubilisé dans un tampon Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 250 mM, pH 8.

Un aliquote de l'échantillon correspondant à 180 g de la biomasse initiale est déposé  
20 sur une colonne de Séphacryl S500 (volume de 6 l, longueur 92 cm, diamètre 8,9 cm, débit de 5 ml/min soit ~5 cm/heure). L'absorbance de l'éluat est suivie à 254 nm. Les fractions contenant l'ADN plasmidique sont récoltées juste après élution du volume mort de la colonne (~2100 ml), alors que celles contenant les ARNs sont récoltées après environ 2 volumes morts (~4100 ml).

Les fractions contenant l'ADN sont ensuite regroupées (volume 1480 ml). L'ADN  
25 plasmidique est concentré par ultrafiltration sur une unité EasyFlow à membrane en triacétate de cellulose de seuil de coupure 20 kDa (Sartorius, réf.14549-OS-IV). Après précipitation par l'éthanol en présence d'acétate de sodium, l'ADN plasmidique est lavé par l'éthanol 80% et séché sous vide puis repris dans un tampon de conditionnement Tris  
30 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5 et stocké congelé à -20°C.

Afin d'analyser la qualité de cet ADN, les paramètres suivants ont été mesurés :

	Biomasse initiale :	360 g (poids humide) de pTG11025 / DH5LE approximativement 1,1 mg d'ADN / DO <sub>600</sub> .ml ).
5	Quantité finale :	120 mg (post Ultrafiltration finale)
	Conditionnement :	1 mg/ml dans Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5
	Protéines contaminantes:	< 0.20 % (n=1) (*)
	ARNs contaminants :	< 1.0 % (n=1) (*)
	Endotoxines :	3,7 UE/mg d'ADN
10	Fonctionnalité :	Actif en transfection <i>in vitro</i>
	Structure :	Conforme par analyse de restriction
	Rendement :	~ 30 %
		(*) valeurs < aux limites de quantification des dosages.

## REVENDICATIONS

1. Procédé pour préparer un ADN plasmidique à partir d'une biomasse cellulaire humide récoltée après fermentation d'une cellule productrice comprenant ledit ADN  
5 plasmidique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
  - a) lyse alcaline de la biomasse resuspendue, après resuspension de la biomasse cellulaire humide,
  - b) acidification à force ionique élevée,
  - c) élimination des insolubles,
  - 10 d) réduction des endotoxines et des acides ribonucléiques (ARN),
  - e) chromatographie de gel filtration, et
  - f) conditionnement.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape de lyse alcaline est  
15 effectuée en présence de soude et de sodium dodécyl sulfate (SDS).
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'étape d'acidification est effectuée en présence d'acétate de potassium à un pH final d'environ 5,1.
- 20 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'étape d'élimination des insolubles comprend au moins une étape de macrofiltration.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend deux à trois étapes successives de macrofiltration sur filtres de porosités décroissantes inférieures à 100  $\mu\text{m}$ ,  
25 40  $\mu\text{m}$  et/ou 16  $\mu\text{m}$ .
6. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend une seule étape de macrofiltration réalisée sur cartouche de porosité égale à 8  $\mu\text{m}$  ou à 3  $\mu\text{m}$ .

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'étape de réduction des endotoxines comprend au moins une étape d'extraction en présence d'un détergent ayant un point nuage compris entre 15°C et 35°C, avantageusement 18°C et 30°C et, de préférence 20°C et 25°C.
- 5
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'étape de réduction des endotoxines comprend 1 à 3 extractions successives réalisées en présence de 1 à 3 % final dudit détergent.
- 10
9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que le détergent est choisi parmi les polyoxyéthylènes.
10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le détergent est le Triton™ X-114.
- 15
11. Procédé selon l'une des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que l'étape de réduction des endotoxines est suivie d'une étape de précipitation alcoolique.
- 20
12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'étape de réduction des ARNs comprend une précipitation sélective des ARNs dans des conditions de haute force ionique.
- 25
13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la précipitation sélective est effectuée en présence de sulfate d'ammonium à une concentration finale comprise entre 2 et 2,5 M.
- 30
14. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la précipitation sélective est effectuée en présence de chlorure de calcium à une concentration finale comprise entre 10 mM et 2M, avantageusement entre 20 mM et 0,5 M, et de manière préférée entre 50 mM et 0,1 M.

15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que l'étape de chromatographie de gel filtration est effectuée sur un support ayant une limite d'exclusion supérieure ou égale à  $20 \times 10^6$  Da.
- 5
16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que le support est sélectionné parmi les supports Séphacryl S500, Séphacryl S1000 et GF2000.
- 10
17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le conditionnement comprend une étape de filtration stérilisante.
- 15
18. Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'il comprend en outre entre les étapes c) et d), d) et e) et/ou e) et f), une étape de concentration suivie, de manière optionnelle, par une étape de précipitation alcoolique et resuspension en phase aqueuse.
- 20
19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que l'étape de concentration est effectuée par ultrafiltration sur membrane ayant un seuil de coupure compris entre 20 et 300 kDa.
- 25
20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que l'étape de concentration est effectuée par ultrafiltration sur membrane ayant un seuil de coupure compris entre 30 et 100 kDa.
- 30
21. Procédé selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisé en ce que l'ADN plasmidique compris dans ladite cellule productrice est un ADN plasmidique recombinant comprenant un gène sélectionné parmi les gènes codant pour une cytokine, un récepteur cellulaire ou nucléaire, un ligand, un facteur de coagulation, la protéine CFTR, l'insuline, la dystrophine, une hormone de croissance, une enzyme, un inhibiteur d'enzyme, un polypeptide à effet antitumoral, un polypeptide capable d'inhiber une infection

bactérienne, parasitaire ou virale et, notamment à VIH, un anticorps, une toxine, une immunotoxine et un marqueur.

5 22. Procédé selon l'une des revendications 1 à 21 pour la préparation d'un ADN plasmidique de taille supérieure à 10 kb.

23. Procédé selon l'une des revendications 1 à 22, caractérisé en ce que la biomasse cellulaire humide est récoltée après fermentation d'une souche d'*Escherichia coli* comprenant un ADN plasmidique recombinant.

10

24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que la souche d'*Escherichia coli* est sélectionnée parmi les souches DH5, DH10B et MC1061.

15 25. Procédé selon l'une des revendications 1 à 24, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) resuspension de la biomasse cellulaire humide,
- b) lyse alcaline de la biomasse resuspendue obtenue à l'étape a) en présence de soude et de SDS,
- c) acidification du lysat alcalin obtenu à l'étape b) en présence d'acétate de potassium à un pH final d'environ 5,1,
- d) élimination des insolubles par macrofiltration du lysat acidifié obtenu à l'étape c),
- e) concentration du filtrat obtenu à l'étape d) par ultrafiltration sur membrane ayant un seuil de coupure compris entre 20 et 300 kDa, de préférence entre 30 et 100 kDa, et précipitation alcoolique suivie d'une resuspension du précipité en milieu aqueux,
- f) réduction des endotoxines du précipité resuspendu à l'étape e) par extraction en présence de Triton™ X-114 suivi d'une précipitation alcoolique et d'une resuspension du précipité en milieu aqueux,
- g) réduction des ARNs du précipité resuspendu obtenu à l'étape f) par précipitation sélective en présence de sulfate d'ammonium ou de chlorure de calcium,
- h) chromatographie de gel filtration du surnageant obtenu à l'étape g) sur un support

Séphacryl S500,

- i) concentration des fractions contenant ledit ADN plasmidique obtenues à l'étape h) par ultrafiltration sur une membrane ayant un seuil de coupure compris entre 20 et 300 kDa, de préférence entre 30 et 100 kDa, et précipitation alcoolique, et
- 5 j) conditionnement par resuspension du précipité obtenu à l'étape i) dans un tampon acceptable d'un point de vue pharmaceutique suivie d'une filtration stérilisante et d'une répartition en doses.

26. Composition pharmaceutique comprenant un ADN plasmidique purifié par le procédé  
10 selon l'une des revendication 1 à 25.

27. Composition pharmaceutique selon la revendication 26, comprenant en outre un composé lipidique.

15 28. Composition pharmaceutique selon la revendication 27, caractérisée en ce que le composé lipidique est choisi parmi le 5-carboxyspermylglycine dioctadecylamide (DOGS), le  $\beta$ 3 ([N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl] cholestérol (DC-Chol), le (2,3-dioleoyl-N-[2(sperminecarboxamido) éthyl] N, N-diméthyl-1-propanaminium trifluoroacétate) (DOSPA), la spermine cholestérol et la spermidine cholestérol.

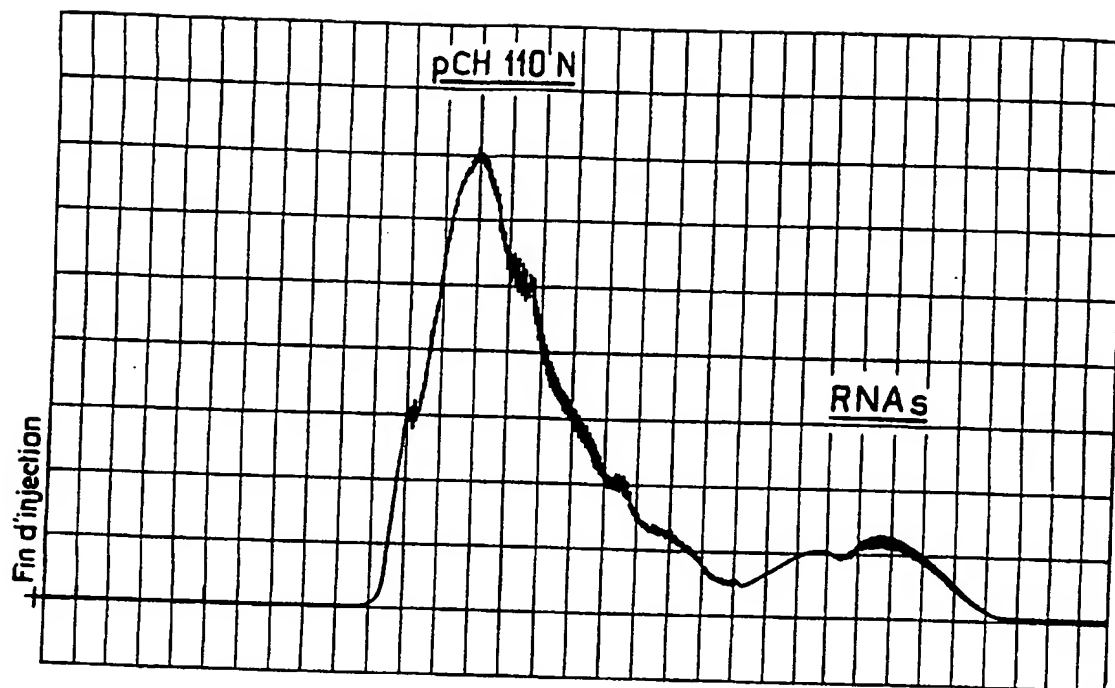
20 29. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 26 à 28, comprenant en outre un adjuvant capable d'améliorer le pouvoir transfectant de ladite composition pharmaceutique.

25 30. Composition pharmaceutique selon la revendication 29, caractérisée en ce que ledit adjuvant est un lipide neutre et, notamment la dioleyl phosphatidyl éthanolamine (DOPE).

30 31. Utilisation d'une composition pharmaceutique selon l'une des revendications 26 à 30, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique.



1 / 6

FIG. 1

2 / 6

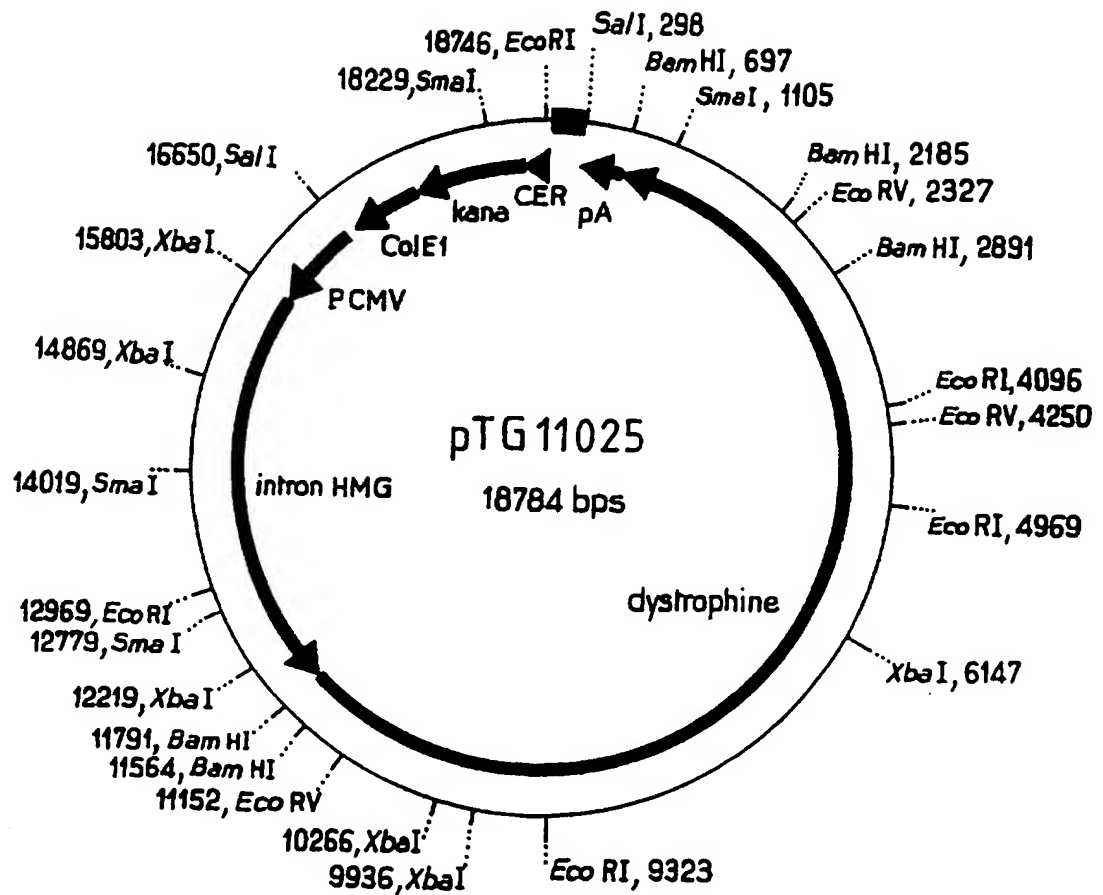


FIG. 2

3 / 6

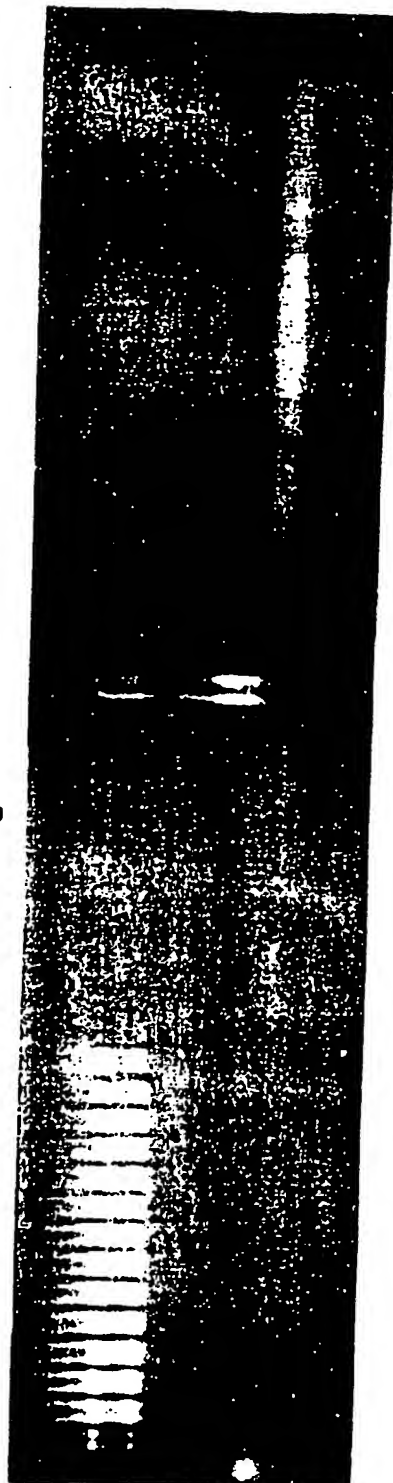
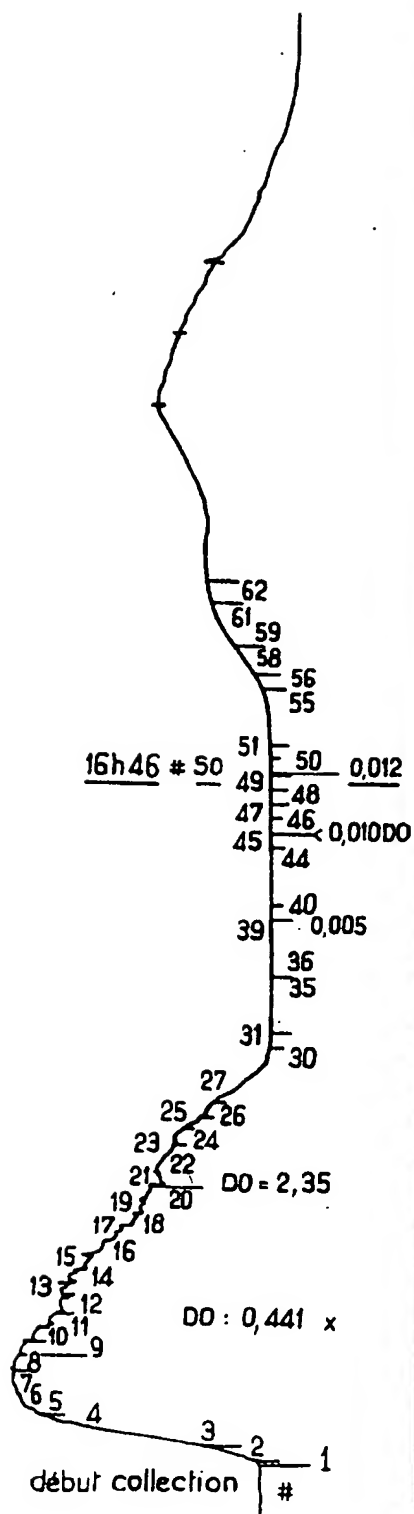
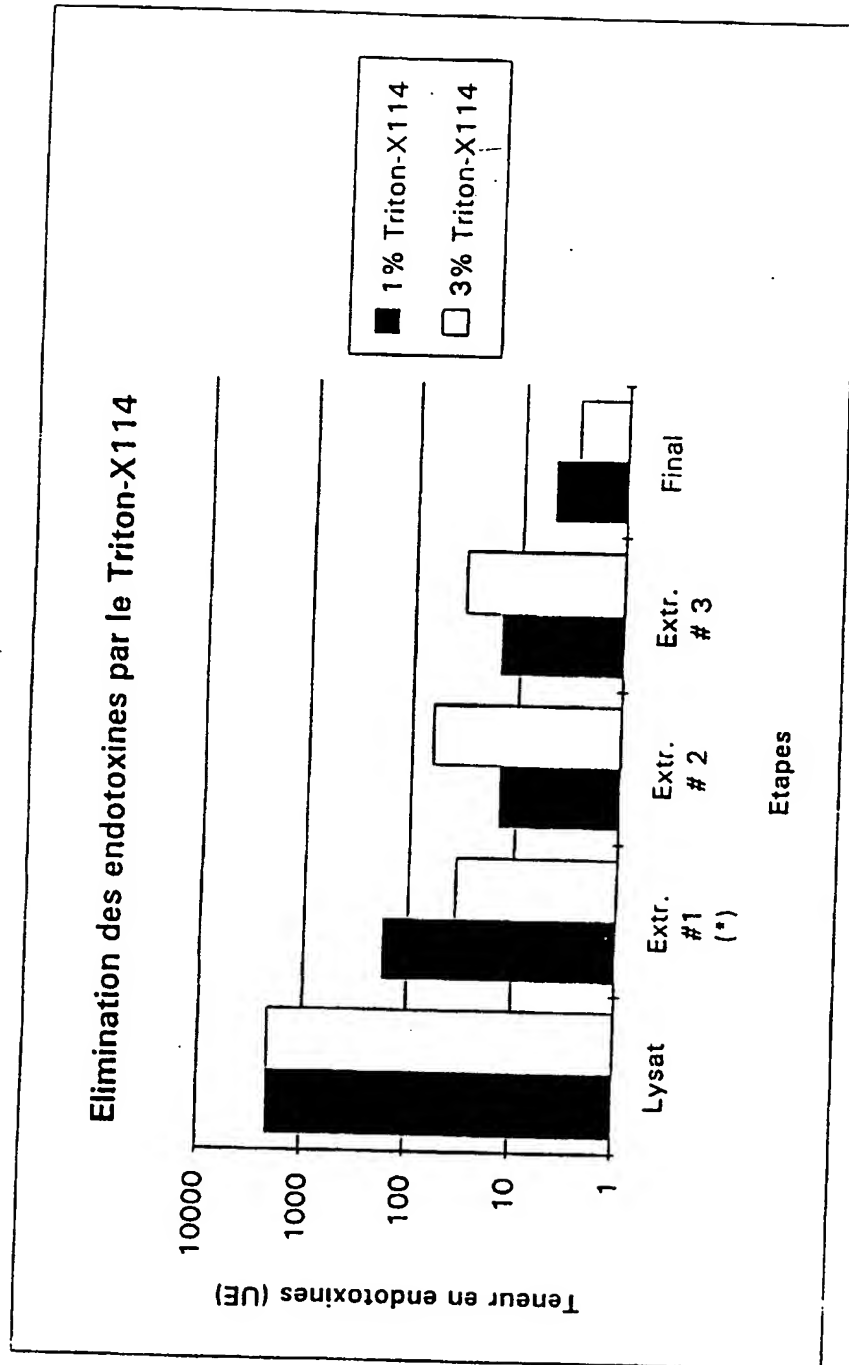


FIG.3

4 / 6



Légende :

Lysat	Lysat alcalin initial
Extr. 1 (*)	Après la 1ère extraction par le Triton X-114
Extr. 2	Après la 2ème extraction par le Triton X-114
Extr. 3	Après la 3ème extraction par le Triton X-114
Final.	Produit final après précipitation alcoolique

**FIG. 4**

5 / 6

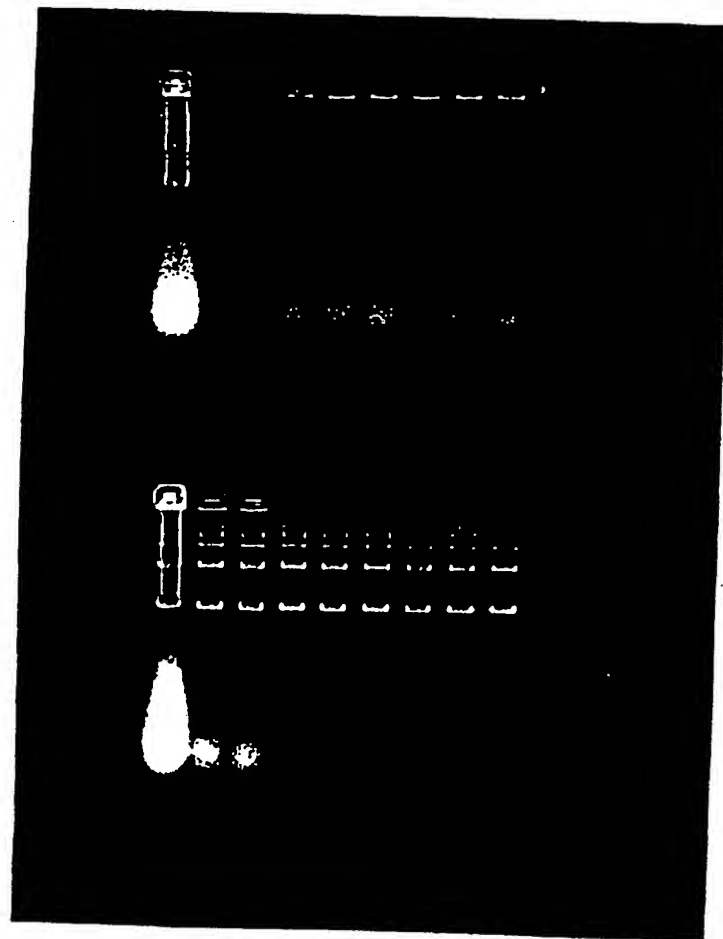
Ligne	Echantillon
1	Lysat alcalin total : Surcharge 10 x
2	Lysat alcalin total
3	Précipitation par 0,5 M final de sulfate d'ammonium
4	Précipitation par 1,0 M de "
5	Précipitation par 1,5 M de "
6	Précipitation par 2,0 M de "
7	Précipitation par 2,5 M de "
8	Précipitation par 3,0 M de "
9	Précipitation par 3,2 M de "

1 2 3 4 5 6 7 8 9

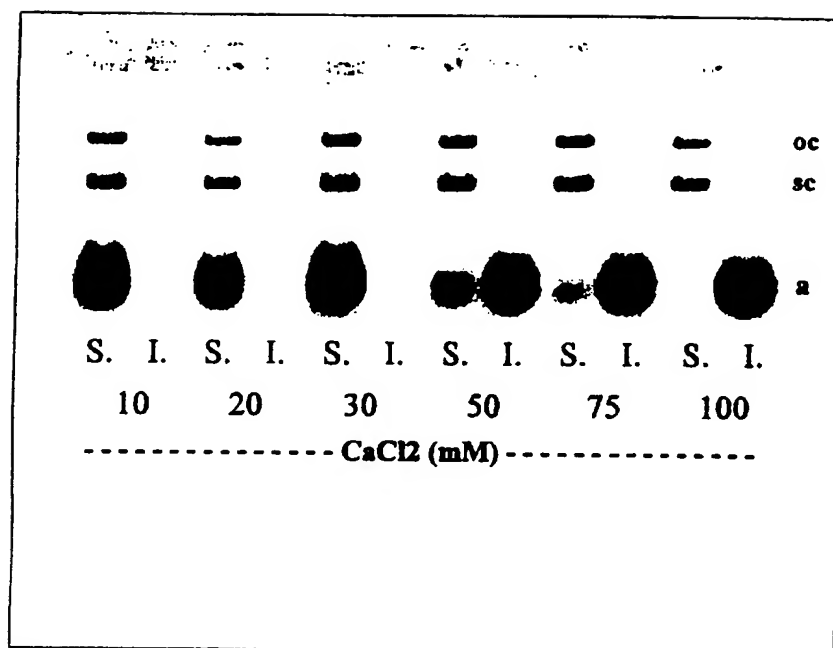
Gel N° 1 :

Matériel précipité  
(ARNs)

Gel N° 2 :

Matériel soluble  
(ADN plasmidique)FIG. 5

6 / 6

FIG.6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/01594

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6 C12N15/10 C07K14/47 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HORN N A ET AL: "CANCER GENE THERAPY USING PLASMID DNA: PURIFICATION OF DNA FOR HUMAN CLINICAL TRIALS" HUMAN GENE THERAPY, vol. 6, no. 5, 1 May 1995, pages 565-573, XP000572705	1-5, 12, 14-18, 21, 23, 24, 26-31
Y	see the whole document	7-11, 25
Y	MONTBRIAND, P.M. & MALONE R.W.: "Improved method for the removal of endotoxin from DNA" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 44, January 1996, AMSTERDAM NL, pages 43-46, XP000673740 see page 43, column 1 - page 44, column 1, paragraph 2	7, 9-11, 25



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 January 1998

Date of mailing of the international search report

10/02/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Chambonnet, F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/01594

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	AIDA, Y. & PABST, M. J.: "Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS., vol. 132, 1990, NEW YORK US, pages 191-195, XP002053532 see the whole document ---	8-10
A	WO 92 18514 A (MINNESOTA MINING & MFG) 29 October 1992 see the whole document ---	1,7
A	WO 95 21250 A (VICAL INC) 10 August 1995 cited in the application see the whole document ---	1
A	EP 0 248 690 A (CLONATEC SA) 9 December 1987 see column 3, line 23 - line 49 ---	6
P,A	WO 96 36706 A (MERCK & CO INC ;LEE ANN L (US); SAGAR SANGEETHA (US)) 21 November 1996 see the whole document -----	7,9,10



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01594

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9218514 A	29-10-92	AU 1978692 A	17-11-92
WO 9521250 A	10-08-95	US 5561064 A	01-10-96
		CA 2179603 A	10-08-95
		EP 0742820 A	20-11-96
		JP 9509313 T	22-09-97
EP 0248690 A	09-12-87	FR 2598435 A	13-11-87
		DK 232187 A	07-11-87
		JP 63068100 A	26-03-88
WO 9636706 A	21-11-96	AU 5921996 A	29-11-96

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 97/01594

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 C12N15/10 C07K14/47 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	HORN N A ET AL: "CANCER GENE THERAPY USING PLASMID DNA: PURIFICATION OF DNA FOR HUMAN CLINICAL TRIALS" HUMAN GENE THERAPY, vol. 6, no. 5, 1 mai 1995, pages 565-573, XP000572705	1-5, 12, 14-18, 21, 23, 24, 26-31
Y	voir le document en entier	7-11, 25
Y	MONTBRIAND, P.M. & MALONE R.W.: "Improved method for the removal of endotoxin from DNA" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 44, janvier 1996, AMSTERDAM NL, pages 43-46, XP000673740 voir page 43, colonne 1 - page 44, colonne 1, alinéa 2	7, 9-11, 25
	---	
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

**\* Catégories spéciales de documents cités:**

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "I" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 janvier 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/02/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem e Internationale No

PCT/FR 97/01594

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	AIDA, Y. & PABST, M. J.: "Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS., vol. 132, 1990, NEW YORK US, pages 191-195, XP002053532 voir le document en entier ----	8-10
A	WO 92 18514 A (MINNESOTA MINING & MFG) 29 octobre 1992 voir le document en entier ----	1,7
A	WO 95 21250 A (VICAL INC) 10 août 1995 cité dans la demande voir le document en entier ----	1
A	EP 0 248 690 A (CLONATEC SA) 9 décembre 1987 voir colonne 3, ligne 23 - ligne 49 ----	6
P,A	WO 96 36706 A (MERCK & CO INC ; LEE ANN L (US); SAGAR SANGEETHA (US)) 21 novembre 1996 voir le document en entier -----	7,9,10

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. a Internationale No

PCT/FR 97/01594

Document brevet cite au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9218514 A	29-10-92	AU 1978692 A	17-11-92
WO 9521250 A	10-08-95	US 5561064 A	01-10-96
		CA 2179603 A	10-08-95
		EP 0742820 A	20-11-96
		JP 9509313 T	22-09-97
EP 0248690 A	09-12-87	FR 2598435 A	13-11-87
		DK 232187 A	07-11-87
		JP 63068100 A	26-03-88
WO 9636706 A	21-11-96	AU 5921996 A	29-11-96